BIOGENESE VON 16α, 17α-EPOXYÖSTRATRIENOL IN RATTENLEBERMIKROSOMEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt von

PETER THULL

aus

Glan-Münchweiler

Bonn 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523713_0045

BIOGENESE VON 16α, 17α-EPOXYÖSTRATRIENOL

IN RATTENLEBERMIKROSOMEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
PETER THULL
aus
Glan-Münchweiler

Bonn 1976

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. H. Breuer
2. Gutachter: Professor Dr. W. Nocke

Aus dem Institut für Klinische Biochemie
der Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. H. Breuer

Herstellung: Druck und Verlag Ing. H. O. Hövelborn 5216 Niederkassel-Mondorf, Provinzialstraße 25
Telefon Bonn 46 27 13

Meinen Eltern

I N H A L T

1. Einleitung

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Steroide

2.1.2 Lösungsmittel und Reagenzien

2.1.3 Versuchstiere

2.1.4 Dünnschichtplatten

2.2 Methoden

2.2.1 Zellfraktionierung

2.2.2 Inkubationsansätze

2.2.3 Aufarbeitung der Inkubationsansätze

2.2.4 Radioaktivitätsmessung

2.2.5 Dünnschichtchromatographie

2.2.6 Messung der Radioaktivität auf Dünnschichtplatten

2.2.7 Elutionstechnik

2.2.8 Gaschromatographie

2.2.9 Massenspektrometrie

2.2.10 Massenfragmentographie

2.2.11 Darstellung von [6,7-$^3H_2$]1,3,5(10),16-Östratetraen-3-ol und [6,7-$^3H_2$]16α,17α-Epoxy-1,3,5(10)östratrienol-3-acetat

3. Ergebnisse

3.1 Synthese von Referenzsteroiden

3.2 Chromatographische Trennung authentischer Referenzsteroide

3.2.1 Derivatbildung

3.2.2 Dünnschichtchromatographie

3.2.3 Gaschromatographie

3.3 Massenspektrometrie

3.4 Inkubationsergebnisse

3.4.1 Vorversuche

3.4.2. Inkubation, Anreicherung und Identifizierung von 16α, 17α- Epoxyöstratrienol

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Nach den Untersuchungen von Breuer et al.(1) kann 16,17-epi--Östriol beim Menschen als Endprodukt von zwei Stoffwechselwegen angesehen werden. Der eine, klassische Weg führt von Östron über 16β-Hydroxyöstron unter Einwirkung einer 17α-Hydroxysteroidoxidoreduktase zu 16,17-epi-Östriol (Abb.1).

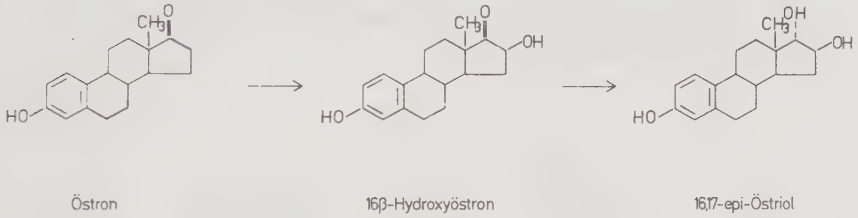

Abb.1
Biosynthese von 16β-Hydroxyöstron und 16,17-epi-Östriol beim Menschen ("Klassische" 16,17-epi-Östriol-Biosynthese)

Ein weiterer Stoffwechselweg, der zu 16,17-epi-Östriol führt, ist unter dem Namen "Epoxydstoffwechselweg" bekannt (Abb.2) (1). Ausgangspunkt ist Testosteron, das durch Dehydratisierung unter Einführung einer Doppelbindung zu dem Δ^{16}-C19-Steroid Androsta-4,16-dien-3-on umgewandelt wird. Diese Verbindung fand Stylianou 1961 (2) nach Inkubation von Testosteron mit menschlichen Leberhomogenaten und Rattentestes.

Knuppen und Breuer (3) zeigten, daß Androsta-4,16-dien-3-on in der menschlichen Plazenta zu Östratetraenol aromatisiert wird. Sowohl Östratetraenol als auch 16α,17α-Epoxyöstratrienol

werden während der Inkubation mit Rattenleberschnitten zu 16,17--epi-Östriol metabolisiert (4). Diese in vitro Untersuchungen ließen sich durch eine in vivo Studie beim Menschen bestätigen (5). Nach Injektion von radioaktivem Östratetraenol und radioaktivem 16α,17α-Epoxyöstratrienol konnte radioaktives 16,17-epi--Östriol aus dem Urin isoliert werden. Stimmel und Notchev wiesen ebenfalls 16,17-epi-Östriol als Metabolit von Östratetraenol im Urin nach (6). Auf Grund dieser Untersuchungen muß der in Abb.2 gezeigte Reaktionsablauf zumindest beim Menschen als möglich angesehen werden.

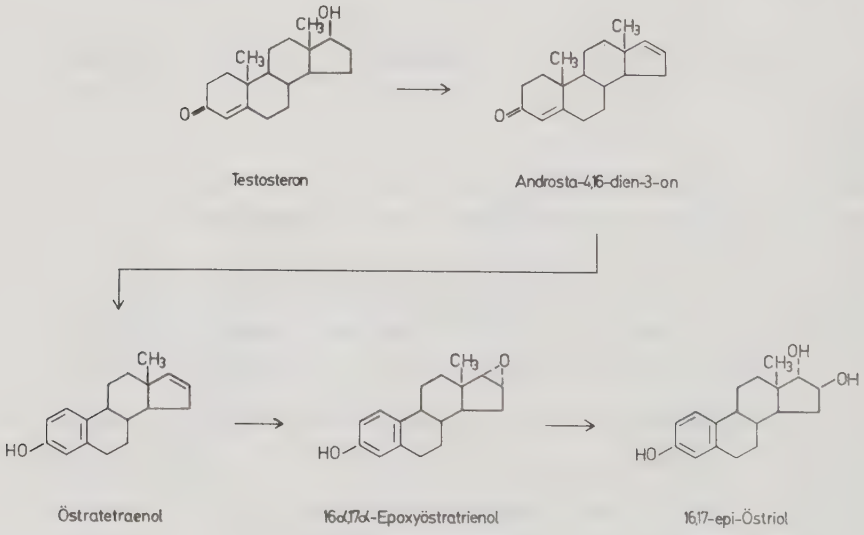

Abb.2
Biosynthese und Stoffwechsel von 16α,17α-Epoxyöstratrienol beim Menschen

Der Reaktionsschritt von Östratetraenol zu 16α,17α-Epoxyöstratrienol konnte noch nicht bewiesen werden, da diese Verbindung bisher nicht isoliert wurde (5). Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, nach Inkubation von radioaktivem Östratetraenol mit der Mikrosomenfraktion der Rattenleber 16α,17α-Epoxyöstratrienol anzureichern und mit modernen analytischen Verfahren zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde als empfindliche und hochspezifische Nachweismethode die kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Steroide

Eine Zusammenfassung aller verwendeten Steroide mit Angaben über die Herkunft, Herstellung und die spezifische Radioaktivität ist in Tab.1 aufgeführt:

Tab.1:
Trivialnamen und systematische Bezeichnungen von Steroiden

Kurzbezeichnung	Systematische Bezeichnung	Herkunft
Östron	3-Hydroxy-1,3,5-(10) östratrien-17-on	Schering, Berlin
Östradiol-17β	1,3,5(10) Östratrien--3,17β-diol	Schering, Berlin
Östriol	1,3,5(10) Östratrien--3,16α,17β-triol	Organon, München
16,17-epi--Östriol	1,3,5(10) Östratrien--3,16β,17α-triol	Ikapharm, Ramat-Gan, Israel
16-epi-Östriol	1,3,5(10) Östratrien--3,16β,17β-triol	Steraloids, Pawling, USA
17-epi-Östriol	1,3,5(10) Östratrien--3,16α,17α-triol	Steraloids, Pawling, USA
Östratetraenol	1,3,5(10),16-Östratetraen-3-ol	eigene Darstellung

Kurzbezeichnung	Systematische Bezeichnung	Herkunft
[6,7-$^3H_2$] Östradiol-17β	[6,7-$^3H_2$] Östratrien-3,17β-diol (Spez.Akt. 48 Ci/mmol)	NEN Chemicals, Dreieichenhain
[6,7-$^3H_2$] Östratetraenol	[6,7-$^3H_2$] 1,3,5(10), 16-Östratetraen-3-ol (Spez.Akt. 6,25 µCi/µmol)	eigene Darstellung
[6,7-$^3H_2$] Östratrienol-oxid	[6,7-$^3H_2$] 16α,17α-Epoxy-1,3,5(10)östratrien-3ol (Spez.Akt. 6,25 µCi/µmol)	eigene Darstellung

2.1.2 Lösungsmittel und Reagenzien

Alle verwendeten Lösungsmittel (Merck, Darmstadt) wurden vor Gebrauch destilliert. $NADPH^+$, Glucose-6-phosphat, Glucose-6--phosphat-Dehydrogenase wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen; Dikaliumhydrogenphosphat, Essigsäureanhydrid, Glucose, Magnesiumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Nicotinsäureamid und Silbernitrat waren von p.a. Reinheitsgrad (Merck, Darmstadt). Hyamin (Hydroxide of Hyamine 10-X, 1m-Lösung in Methanol) und "PPO" (2,5 Diphenyloxazol), Scintillation Grade,wurden von Packard, Frankfurt, bezogen.

2.1.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche, 200 - 300 g schwere Wistar--Ratten verwendet. Die Tiere erhielten Wasser und Futter (Altromin) ad libitum.

2.1.4 Dünnschichtplatten

Zur Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 F 254 beschichtete Alufolien und DC - Fertigplatten Kieselgel F 254 der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellfraktionierung

Die verwendeten Ratten wurden durch Genickschlag getötet. Mit einer Schere wurden die Halsgefäße durchtrennt. Die Leber wurde entnommen, von anhängendem Bindegewebe befreit, in eingewogene, gekühlte (0-5°C) Rohrzuckerlösung (0,25 m) gelegt und abgewogen.

Vom Beginn der Entnahme bis zum Beginn der Aufarbeitung vergingen nicht mehr als 10 min. Die Leber wurde mit einer Schere zerkleinert und mit der vierfachen Menge an Rohrzuckerlösung (0,25 m) in einem Glashomogenisator feinhomogenisiert. Das Homogenat (20%) wurde wie folgt zentrifugiert:

(1) 10 min bei 600 x g
(2) 10 min bei 25 000 x g
(3) 60 min bei 100 000 x g
(4) 60 min bei 100 000 x g

Die Sedimente der Zentrifugationsgänge (1) und (2) wurden verworfen. Die Überstände von (1) und (2) wurden jeweils zur weiteren Zentrifugation herangezogen.

Das Sediment des Zentrifugationsganges (3), in dem sich die Mikrosomenfraktion befand, wurde mit Hilfe eines Glasstempels in Rohrzuckerlösung (0,25 m) in den Zentrifugenröhrchen aufgeschwemmt. Es folgte die Zentrifugation (4).

Das Sediment wurde dann nochmals mit einem Glashomogenisator homogenisiert und so suspendiert, daß 1 ml Rohrzuckerlösung (0,25 m) die Mikrosomenfraktion von 1 g Leber enthielt.

Die Zentrifugationen (1) und (2) wurden mit einer Zentrifuge Christ, Typ Zeta 20, die Zentrifugationen (3) und (4) mit einer Spinco L 50, Beckman, durchgeführt.

2.2.2 Inkubationsansätze

Zur Inkubation wurde das in Essigsäureäthylester gelöste Substrat [6,7-$^3H_2$] Östratetraenol eingedampft und in Äthanol aufgenommen. Die Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

Substrat	:	[6,7-$^3H_2$] Östratetraenol	30 µg bzw. 100 µg
Enzym	:	Mikrosomensuspension	1 ml
Kofaktoren	:	$NADPH^+$	4 mg
		Glucose-6-phosphat	30,4 mg
		Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	9,6 U
		Nicotinsäureamid	24,42 mg
Puffer	:	Phosphatpuffer pH 8,0	8 ml
		enthaltend:	
		Magnesiumchlorid	1 µMol/l

Hinzu kam in einem Teil der Ansätze als Inhibitor noch Epoxystyrol (120 µg, gelöst in Äthanol). Es wurde in einem Wasserbad bei 30°C unter Luftsauerstoff inkubiert. Die Inkubationszeiten betrugen 1,2,4 und 10 Minuten. Vor Hinzugabe von [6,7-$^3H_2$] Östratetraenol wurden alle Proben 10 min bei den genannten Bedingungen vorinkubiert. Bei einigen Leerwertinkubationsansätzen wurde ohne Zugabe von [6,7-$^3H_2$] Östratetraenol angesetzt.

2.2.3 Aufarbeitung der Inkubationsansätze

Die Inkubationslösungen wurden jeweils mit dreimal 10 ml Äther/Chloroform (3:1, Vol/Vol) extrahiert und die organischen Lösungsmittel eingedampft. Die Ruckstände wurden in 10 ml Di-

chlormethan aufgenommen, die Lösungen zweimal mit 2 ml Wasser gewaschen und wieder eingedampft. Daran schloß sich eine Acetylierung des Reaktionsgemisches an. Zu diesem Zweck wurden die Extrakte mit einem Gemisch Essigsäureanhydrid/Pyridin (1:1, Vol/Vol) über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen.

2.2.4 Radioaktivitätsmessung

Zur Messung der Radioaktivität in den Extrakten und wässrigen Phasen wurde ein Flüssigkeitsszintillationsspektrometer Mark II, Nuclear Chicago, verwendet. Von den Äther/Chloroform-Extrakten wurden Aliquote in Zählröhrchen eingedampft und mit 8 ml einer Lösung, die 4 g/l PPO in Toluol enthielt, aufgenommen. Zur Bestimmung der Radioaktivität in den wässrigen Phasen wurden 100 µl mit 0,5 ml Hyaminlösung und 1,5 ml absolutem Äthanol stehengelassen (15 min) und mit 15 ml einer Lösung von 4 g/l PPO in Toluol aufgenommen. Die Zählausbeute wurde mit Hilfe einer externen Standardisierung korrigiert.

2.2.5 Dünnschichtchromatographie

Zur Reinigung von Substanzen, die bei der Gaschromatographie und Massenspektrometrie hätten stören können, wurden die verwendeten Dünnschichtplatten in einer Durchflußkammer mit Methanol/Dichlormethan (1:1, Vol/Vol) aufsteigend behandelt. Zur Argentationschromatographie wurden DC-Fertigplatten Kieselgel F 254 zweimal in einer Lösung von Silbernitrat (2%) in Acetonitril aufsteigend entwickelt. Als Lösungsmittelsystem zur Chromatographie wurde reines Dichlormethan verwendet. Alle Chromatogramme wurden in einem temperaturkonstanten Raum ent-

wickelt. Die Referenzsubstanzen wurden auf den mit Silbernitrat imprägnierten DC-Fertigplatten Kieselgel F 254 durch Besprühen mit konzentrierter Schwefelsäure und anschließendes Erhitzen (etwa 100°C), auf den nicht vorpräparierten Platten unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

2.2.6 Messung von Radioaktivität

Die Verteilung der Radioaktivität auf den DC-Platten wurde mit Hilfe eines Radiochromatogrammscanners (Berthold) vorgenommen.

2.2.7 Elutionstechnik

Die Metaboliten wurden entweder durch parallel laufende Chromatogramme von Referenzsubstanzen oder mit dem Radiochromatogrammscanner lokalisiert. Zur Elution wurden die entsprechenden Zonen abgetragen und mit Dichlormethan in einem Frittengefäß eluiert.

2.2.8 Gaschromatographie

Zur Gaschromatographie wurde das Gerät Philips/Pye 104/106, ausgerüstet mit einem Flammenionisationsdetektor, verwendet. Die Untersuchungsbedingungen waren: Einlaßtemperatur 260°C, Temperatur des Flammenionosationsdetektors 300°C, Trägergas 30 ml/min nachgereinigter Stickstoff. Die Trennungen wurden an folgenden Säulen durchgeführt: 3 % OV-101 auf Chromosorb W-HP 100/120 mesh, Länge x Innendurchmesser: 210 x 0,3 cm, Temperatur: 245 bzw. 255°C; 3 % Dexsil 300 auf Chromosorb W--HP 100/120 mesh, Länge x Innendurchmesser: 270 x 0,4 cm, Temperatur 280 bzw. 300°C. Die Säulenbelegungen wurden von Werner Günther, Düsseldorf, bezogen. Die jeweils injizierten Mengen

betrugen zwischen 0,1 µg und 0,5 µg.

2.2.9 Massenspektrometrie

Die Untersuchungen wurden mit einem kombinierten Gaschromatograph-Massenspektrometer LKB 9000 (LKB Produkter, Bromma, Schweden) durchgeführt. Die gaschromatographischen Bedingungen waren: Säule: 3 % Dexsil 300 auf Chromosorb W-HP 100/120 mesh, Länge x Durchmesser 130 x 0,2 cm; Einlaßtemperatur 250°C, Säulentemperatur 235°C, Temperaturprogramm 1,5° C/min, Temperatur des Molekülseparators 240°C, Temperatur der Ionenquelle 250°C, Trägergas 20 ml/min Helium, Ionisierungsenergie 35 eV, Emissionsstrom 60 µA, Einlaßschlitz 0,1 mm, Auslaßschlitz 0,1 mm, Abtastgeschwindigkeit von m/e 4 bis 500 in 8 sec, Papiervorschub 1 cm/min, Filter 240 Hz. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte kurz vor dem Maximum der gaschromatographischen Peaks.

2.2.10 Massenfragmentographie

Durch die Einstellung geeigneter m/e - Werte war es mit Hilfe der kombinierten Gaschromatographie - Massenspektrometrie möglich, auch in ungereinigten Extrakten Metaboliten quantitativ und qualitativ zu bestimmen. Zum Zwecke der Einstellung der Gerätekombination wurden authentische Referenzsteroide durch das Direkteinlaßsystem des Massenspektrometers in die Ionenquelle eingeführt. Die Magnetfeldstärke wurde so variiert, daß das Peakmaximum des Molekülions oder eines geeigneten Fragmentions auf dem UV-Lichtpunktschreiber des Massenspektrometers abgebildet wurde. Zur Aufnahme von Fragmentogrammen wurde die authentische Referenzverbindung aus der Ionenquelle entfernt und die

zu untersuchende Probe in den Gaschromatographen des Kombinationsinstrumentes injiziert.

2.2.11 Darstellung von [6,7-$^3H_2$] 1,3,5(10),16-Östratetraen-3--ol und [6,7-$^3H_2$] 16α,17α-Epoxy-1,3,5 (10) östratrien-3-ol-acetat

Darstellung von [6,7-$^3H_2$] Östradiol-3,17β-dibenzoat

Ein Gemisch von 20 mg Östradiol-17β und 460 µCi tritiierten Östradiol-17β wurde nach Zugabe von 100 µl Pyridin und 40 µl Benzoylchlorid 30 min auf 80° C erhitzt. Nach dem Abkühlen und der Zugabe von 4 ml H_2O wurde mit 1 ml konz. HCL angesäuert, anschließend dreimal mit 5 ml Dichlormethan extrahiert. Diese Lösung wurde dann mit 5 ml gesättigter Natriumbikarbonatlösung gewaschen, eingedampft und in 10 ml Essigsäureäthylester aufgenommen.

Darstellung von [6,7-$^3H_2$] Östratetraenol-3-monobenzoat

Nach dem Eindampfen schloß sich eine Umsetzung von Östradiol--3,17β-dibenzoat zum Östratetraenol-3-monobenzoat an. Für diese thermolytische Reaktion wurde ein präparativer Gaschromatograph mit einem automatischen Injektionssystem benutzt. Die Bedingungen waren: 3 % Dexsil 300 auf Chromosorb W-HP 100/120 mesh, Länge x Durchmesser 160 x 0,4 cm; Einlaßtemperatur 350° C, Säulentemperatur 360° C, Auslaßheizung 280° C, Stickstoffgasstrom 5 ml/min. Die Auffangdauer betrug 12 h. Das Umsetzungsprodukt wurde mit einer mit Glasperlen 100/120 mesh gefüllten Falle aufgefangen. Die Substanz wurde mit Dichlormethan/Methanol (9:1, Vol/Vol) aus dem Glasmaterial eluiert. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der Rückstand in 1 ml Methanol auf-

genommen. Die Wiederfindung betrug 50%, wie anhand der Radioaktivität berechnet wurde. Das Reaktionsgemisch wurde nun auf eine Dünnschichtplatte gegeben und im System Dichlormethan aufsteigend entwickelt. Die Verteilung der Radioaktivität auf der Dünnschichtplatte wurde anschließend mit Hilfe des Radiochromatogrammscanners gemessen. Es zeigte sich, daß Östratetraenol--3-benzoat von dem nicht umgesetzten Östradiol-3,17β-dibenzoat getrennt werden konnte. Nach Abtragen von der DC-Platte wurde die Substanz mit Dichlormethan eluiert.

Darstellung von $[6,7\text{-}^{3}H_2]$ Östratetraenol

Das Monobenzoat von Östratetraenol wurde mit 3 ml 5 % methanolischer KOH-Lösung versetzt und 1 h unter Stickstoff bei 85°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 5 ml Wasser und ½ ml konz. HCL zugegeben; daraufhin wurde dreimal mit je 10 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Die Messung der Radioaktivität in einer aliquoten Menge ergab, daß von den ursprünglich eingesetzten 20 mg Östradiol-17β 4,18 mg, entsprechend 20,9 %, zu Östratetraenol umgesetzt werden konnten. Das Produkt erwies sich gaschromatographisch und dünnschichtchromatographisch einheitlich. Die Identität konnte durch die kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie bewiesen werden.

Darstellung von $[6,7\text{-}^{3}H_2]$ 16α,17α-Epoxyöstratrienolacetat

100 µg nicht-radioaktiv markiertes Östratetraenol und 30 µg radioaktiv markiertes Östratetraenol werden zusammen über Nacht bei Raumtemperatur mit 100 µl Pyridin und 100 µl Essigsäureanhydrid acetyliert. Nach dem Eindampfen wurde dem Rückstand 300 µl einer 0,15 m Benzoepersäurelösung in Äther zugegeben

und einen Tag stehengelassen. Anschließend wurde je zweimal mit 1,5 ml 0,1 m K_2CO_3, 1,5 ml H_2O, 1,5 ml 0,1 n HCL und mit 1,5 ml H_2O extrahiert; die wässrigen Extrakte wurden verworfen. Nach dem Eindampfen und erneutem Aufnehmen in Dichlormethan ergab die Messung der Radioaktivität, daß von den ursprünglich eingesetzten 130 µg Östratetraenol 40 µg zu 16α,17α-Epoxyöstratrienolacetat umgesetzt worden waren. Das Produkt erwies sich als dünnschichtchromatographisch und gaschromatographisch einheitlich. Die Identität konnte durch die kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie bewiesen werden.

3. Ergebnisse

3.1 Synthese von Referenzsteroiden

Darstellung von Östratetraenol

Gower (7) referierte 1972 drei Methoden zur Darstellung von Östratetraenol. Nach Huffman (8) kann aus Östra-3,16β-diol-3--benzoat-16β-tosylat durch Kochen in Kollidin unter Rückfluß Östratetraenol-3-benzoat gewonnen werden. Eine anschließende Verseifung mit 0,1 n NaOH führt zu Östratetraenol. Eine andere Methode stammt von Caglioti und Magi (9). Diese Untersucher gelangten zum Östratetraenol-3-methyläther, indem sie das 17-Tosylhydrazon des Östron-3-methyläthers mit Lithiumaluminiumhydrid in trockenem Tetrahydrofuran durch Kochen unter Rückfluß umsetzten. Eine weitere Methode ist von Prelog et al. (10) angegeben. In ihren Untersuchungen beschreiben diese Autoren eine trockene Destillation von Östradiol-3,17β-dibenzoat im Vakuum bei 300-310° C, wobei durch die Abspaltung des Benzoesäurerestes an C-17 Östratetraenol-3-monobenzoat entsteht. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde diese dritte Methode zur Darstellung von Östratetraenol angewandt. Die einzelnen Stufen dieser Synthese sind in Abb.3 zusammengefaßt.

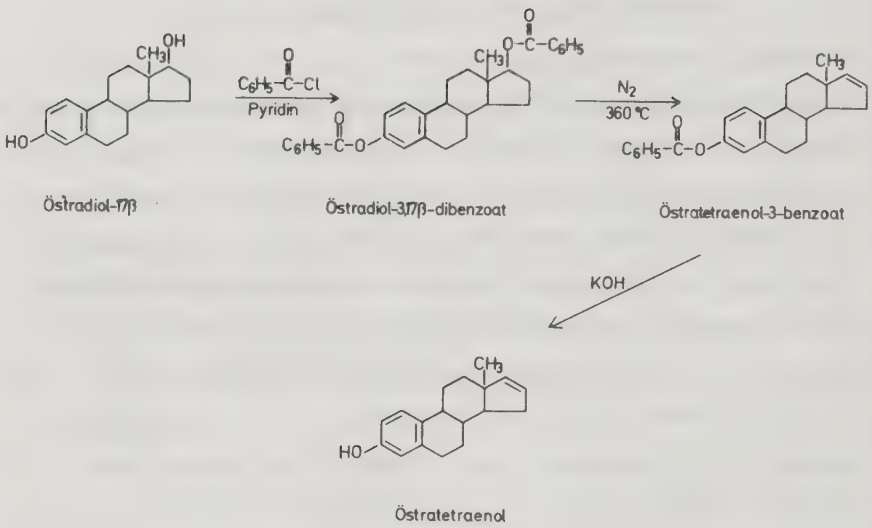

Abb.3
Darstellung von Östratetraenol nach Prelog et al. (10).

Aus tritiiertem Östradiol-17β gewinnt man mit Benzoylchlorid in Pyridin das entsprechende 3,17β-Dibenzoat. Die anschließende trockene Destillation ist der wichtigste und zugleich schwierigste Reaktionsschritt. Eine optimale Ausbeute an Östratetraenol--3-benzoat kann nur dann erwartet werden, wenn die Reaktionsbedingungen, insbesondere Temperatur und Trägergasstrom, möglichst genau reguliert werden. Dies war in besonderem Maße erforderlich, da nur sehr geringe Mengen an radioaktivem Steroid eingesetzt wurden. Es wurde deshalb ein präparativer Gaschromatograph als Reaktionsofen verwendet, bei dem eine exakte Regulierung von Temperatur und Gasstrom möglich war. Als Reaktionsgefäß diente eine Glaskolonne, die mit 3 % Dexsil 300 auf Chro-

mosorb, W-HP, 100-120 mesh, gefüllt war. Bei der hier beschriebenen Reaktion diente die stationäre Gaschromatographie--phase nicht zur gaschromatographischen Trennung, sondern lediglich zur Desaktivierung des Trägermaterials und zur Absorption der Ausgangsverbindung, so daß eine möglichst große Verweilzeit im Reaktionsofen gewährleistet war. In der Kühlfalle des Gaschromatographen konnte radioaktives Östratetraenol-3--benzoat als Reaktionsprodukt mit einer Ausbeute von 20,9 % aufgefangen werden. Die anschließende Verseifung mit methanolischer Kaliumhydroxydlösung entsprechend der Vorschrift von Huffmann (8) führt zum radioaktiv markiertem Östratetraenol.

Darstellung von 16α,17α-Epoxyöstratrienol-3-acetat

Die Darstellung des 16α,17α-Epoxyds wurde 1945 zum erstenmal von Prelog et al. beschrieben (10). Diese Untersucher setzten eine Lösung von Östratetraenol-3-benzoat in Dichlormethan mit Benzoepersäure gelöst in Chloroform in 15 h bei -10° C zum 16α,17α-Epoxyöstratrienol-3-benzoat um. Das 3-Benzoat von 16α,17α-Epoxyöstratrienol wurde dann mit methanolischer Kalilauge unter Kochen am Rückfluß zum 16α,17α-Epoxyöstratrienol verseift. Bei der vorliegenden Untersuchung wurde Östratetraenol zunächst in 3-Position acetyliert und anschließend mit Benzoepersäure zum 16α,17α-Epoxyöstratrienol-3-acetat umgesetzt. Durch die kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie konnte die Identität von 16α,17α-Epoxyöstratrienol-3-acetat bewiesen werden.

3.2 Chromatographische Trennung authentischer Referenzsteroide

3.2.1 Derivatbildung

Das chromatographische Verhalten von Steroiden kann mitunter deutlich verbessert werden, wenn freie Hydroxygruppen durch die Bildung von Derivaten gegen irreversible Adsorption geschützt werden. Insbesondere sind die Trimethylsilyläther der Steroide für gaschromatographische Untersuchungen geeignet. Es zeigte sich jedoch, daß die beiden isomeren Verbindungen 16α,17α-Epoxyöstratrienol und Östron weder als Silyläther noch als freie Verbindungen voneinander getrennt werden konnten. Es wurden deshalb die Essigsäureester der Steroide als Derivate verwendet, die sowohl für die gaschromatographische als auch für die dünnschichtchromatographische Trennnung der untersuchten Steroide geeignet sind.

3.2.2 Dünnschichtchromatographie

Das dünnschichtchromatographische Verhalten der untersuchten Steroide an Kieselgel ist aus Tab.3 zu entnehmen. Als Lösungsmittelsystem zur Entwicklung der Chromatogramme hat sich reines Dichlormethan bewährt. Eine Trennung von Steroiden, die sich nur durch eine Doppelbindung unterscheiden, ist mit der konventionellen Dünnschichtchromatographie sowie der Gaschromatographie erwartungsgemäß nicht möglich. Es wurde deshalb die Argentationsdünnschichtchromatographie herangezogen. Zu diesem Zweck wurden käufliche, mit Kieselgel beschichtete Dünnschichtplatten mit einer Lösung von Silbernitrat in Acetonitril entwickelt. Nach einstündigem Trocknen an der Luft wurden die zu trennenden

Substanzen aufgetragen und mit Dichlormethan als Lösungsmittelsystem entwickelt.

Tab.3:
Dünnschichtchromatographisches Verhalten (R_F-Werte) phenolischer Steroidacetate

Steroidacetat	60 F 254 (auf Alufolie)	Kieselgel F 254 (auf Glas)	Kieselgel F 254 (auf Glas) 5 % $AgNO_3$*	Kieselgel F 254 (auf Glas) 2x2% $AgNO_3$**
Östron-3-acetat	0,19	0,20	0,18	0,20
Östratetraenol--3-acetat	0,55	0,49	0,03	0,04
16α,17α-Epoxyöstratrienol-3--acetat	0,38	0,37	----	0,30
Östriol-3,16α, 17β-triacetat	0,12	----	0,14	----
16,17-epi--Östriol-3,16β, 17αtriacetat	0,12	----	0,13	----
16-epi-Östriol--3,16β,17β-triacetat	0,12	----	0,09	----
17-epi-Östriol--3,16α,17α-triacetat	0,12	----	0,10	----

* Vorbehandlung durch 1-faches Entwickeln der Platten in einer Lösung von 5 % Silbernitrat in Acetonitril

** Vorbehandlung durch 2-faches Entwickeln der Platten in einer Lösung von 2 % Silbernitrat in Acetonitril

Vergleicht man die R_F-Werte der Referenzsteroide (Tab.3), so kann man feststellen, daß Östratetraenol, eine Verbindung mit einer Doppelbindung in Ring D, bei der konventionellen Dünnschichtchromatographie den größten R_F-Wert von allen untersuchten Verbindungen besitzt. Bei der Argentationsdünnschichtchromatographie hingegen verringert sich die Wanderungsgeschwindigkeit deutlich im Vergleich zu den übrigen Steroiden, die keine Ring-D-Doppelbindung aufweisen. Dieses Prinzip der Argentationsdünnschichtchromatographie konnte auch für die Trennung des 16α,17α-Epoxyöstratrienols von einem Doppelbindungsanalogen im Inkubationsextrakt nutzbar gemacht werden.

Das gaschromatographische Verhalten der verwendeten Steroide kann der Tabelle 4 entnommen werden. Die relativen Retentionszeiten sind auf die von 5α-Cholestan = 1,00 bezogen.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, wurden die Acetylester der untersuchten Östrogene sowohl an der OV-101-Säule als auch an der Dexsil 300-Säule einwandfrei voneinander getrennt. Mit Hilfe dieses Analysenverfahrens sollte es möglich sein, das erwartete Inkubationsprodukt 16α,17α-Epoxyöstratrienol von anderen Steroiden abzutrennen.

Tab.4:
Gaschromatographisches Verhalten phenolischer Steroidacetate, Relative Retentionszeiten bezogen auf 5α-Cholestan=1,00

Referenzsteroid	Relative Retentionszeiten	
	3 % OV 101	3 % Dexsil 300
Östron-3-acetat	0,66	0,97
Östratetrenolacetat	0,32	0,39
16α,17α-Epoxyöstra-trienolacetat	0,59	0,80
Östriolacetat	1,58	1,73
16,17-epi-Östriol-acetat	1,66	1,86
16-epi-Östriolacetat	1,86	2,2
17-epi-Östriolacetat	1,78	2,1

3.3 Massenspektrometrie

Das massenspektrometrische Verhalten des Acetylesters der Referenzverbindung ist in Abb.7 dargestellt. Die Verbindung ergibt im Massenspektrometer relativ kleine Molekülionen bei m/e 312 (Östratrienoloxidacetat) und m/e 296 (Östratetraenolacetat). Durch Abspaltung von Keten (CH_2=C=O) entsteht ein M-42-Fragmention (m/e 270 bei Östratrienoloxid und m/e 254 bei Östratetraenol). Dieses Ion, dessen Struktur der nichtderivatisierten Verbindung sehr ähnlich sein dürfte (11), ergibt in allen Spektren einen Peak mit der höchsten relativen Intensität (Base-Peak). Im übrigen weisen die Spektren eine Reihe von kleineren Fragmenten auf, die im wesentlichen denen des freien

Östrons entsprechen (m/e 146,172,185)(11). Für den massenfragmentographischen Nachweis des Epoxyöstratrienols bietet sich der Base-Peak des Spektrums bei 270 für die Einstellung des Spektrometers an. Es ist so möglich, etwa 1 ng Epoxyöstratrienolacetat massenfragmentographisch nachzuweisen. Eine Verwechslung mit Östronacetat, das ebenfalls seinen Base-Peak bei m/e 270 hat, ist wegen der Unterschiede in den gaschromatographischen Retentionszeiten nicht möglich.

3.4 Ergebnisse der Inkubationsversuche

3.4.1 Vorversuche

Ziel der Vorversuche war es, die besten Versuchsbedingungen herauszufinden, um eine möglichst große Menge an 16α,17α-Epoxyöstratrienol für eine eindeutige Identifizierung im Massenspektrometer zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Inkubationen unter verschiedenen Bedingungen angesetzt, wie sie der Tabelle 5 entnommen werden können. Die Bedingungen lehnten sich an die von Grover, Hewer und Sims beschriebenen an (12). Die jeweils inkubierte Substratmenge betrug 30 µg Östratetraenol. Dabei wurden Inkubationen mit und ohne Zusatz von Epoxystyrol als Inhibitor durchgeführt. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 1 und 4 min. Insbesondere zeigte sich der Zusatz von Epoxystyrol als Inhibitor als geeignet zur Darstellung von 16α,17α-Epoxyöstratrienol. Die Inkubationsansätze wurden wie in 2.2.3 angegeben aufgearbeitet. Nach einmaligem Entwickeln der Extrakte auf einer Kieselgeldünnschichtplatte im Lösungsmittelsystem Dichlormethan wurden die der Östriol-, Östron-, Epoxyöstratrienol- und die der Östratetra-

enolfraktion entsprechenden Zonen von der Dünnschichtplatte abgetragen und eluiert. Daran schloß sich die fragmentographische Untersuchung der Eluate an. Als geeignet erwies sich die m/e-Einstellung 270 für Östronacetat und Epoxyöstratrienolacetat, 272 für die Östriolfraktion. Trotz der gleichen m/e-Einstellung für verschiedene Substanzen wie z.B. Östronacetat und Epoxyöstratrienolacetat gelang auf Grund der unterschiedlichen Retentionszeiten eine qualitative Unterscheidung der Steroide. Die quantitative Bestimmung der Metabolite erfolgte anhand von Standardlösungen, die ebenfalls injiziert wurden. Eine Zusammenstellung der Metaboliten, die fragmentographisch quantitativ bestimmt wurden, läßt sich aus Tabelle 5 entnehmen.

Aus der Tabelle 5 läßt sich entnehmen, insbesondere bei den 2- und 4-min-Inkubationen, daß durch den Zusatz von Epoxystyrol als Inhibitor der letzte Schritt des Reaktionsablaufes von 16α,17α-Epoxyöstratrienol zum 16,17 -epi-Östriol deutlich gehemmt wurde. Während zum Beispiel nach Zusatz des Inhibitors nach 2 min Inkubation 720 ng Epoxyd nachgewiesen werden konnten, fand man ohne jeglichen Zusatz von Epoxystyrol nur 184 ng.

Tab.5:
Stoffwechselprodukte nach Inkubation von Östratetraenol mit Rattenlebermikrosomen

Inkubationszeit in Minuten	Substrat µg	Inhibitor µg	Östriol ng	16,17-epi-Östriol ng	Östron ng	Epoxydfraktion ng	Östratetraenol µg	Menge d.i.d. Wasserph.verblieb.radioakt.Subst. µg
1	30	120	92	--	17	160	17	5,1
1	30	--	25	45	48	320	23	4,7
1	--	--	--	--	7	--	--	--
2	30	120	154	206	5	720	21	3,4
2	30	--	228	239	15	184	23	3,6
2	--	--	--	--	3	--	--	--
4	30	120	--	193	5	693	16	6,0
4	30	--	--	86	5	186	19	3,2
4	--	--	--	--	2	--	--	--

3.4.2 Inkubation, Anreicherung und Identifizierung von 16α, 17α-Epoxyöstratrienol

Die Versuche, das nach Inkubation von 30 µg Östratetraenol erhaltene 16α,17α-Epoxyöstratrienol im Massenspektrometer zu identifizieren, erwiesen sich als unbefriedigend, da die Lösungen mit der zu identifizierenden Substanz zu viele Verunreinigungen aus dem biologischen Material enthielten. Zu diesem Zweck wurden Inkubationen mit 100 µg Östratetraenol bei sonst gleicher Zusammensetzung der Ansatzproben durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 4 min. Gleichzeitig wurde den Inkubationsansätzen Epioxystyrol als Inhibitor zugesetzt. Die Ansätze wurden wie bei den Vorversuchen aufgearbeitet. Auch bei diesem Experiment konnte nach dünnschichtchromatographischer Reinigung bei dem m/e-Wert 270 mit derselben Rententionszeit von authentischem 16α,17α-Epoxyöstratrienol ein Peak aufgezeichnet (Abb.4) werden.

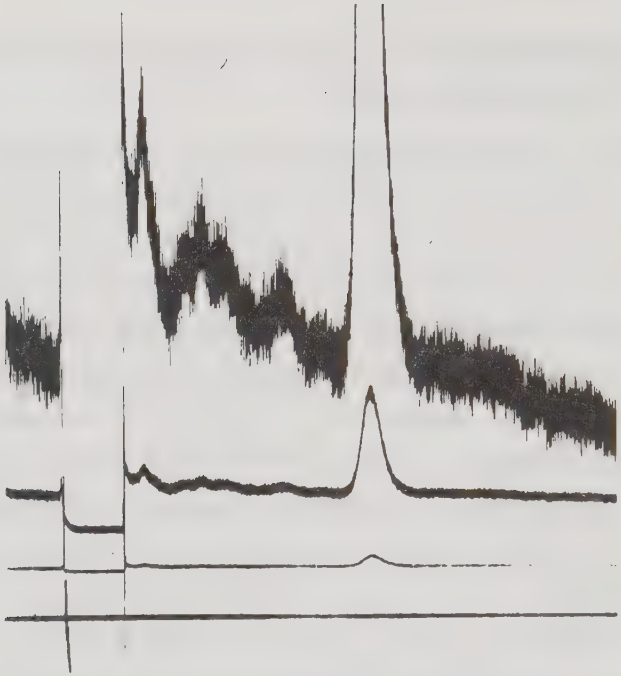

Abb.4:
Massenfragmentogramm des Inkubationsextraktes
Gaschromatographie: 3 % Dexsil 300, Temperatur 280 - 300° C,
Massenspektrometrie: m/e 270, Ionenquelle: 250°C, Ionisationsstrom: 60 µA, Ionisationsenergie 30 eV

Es war erstaunlich, daß nicht nur das Fragmentogramm bei m/e 270, sondern auch das gleichzeitig aufgezeichnete Gaschromatogramm, das den Totalionenstrom anzeigt, mit derselben Retentionszeit einen deutlichen Peak anzeigte. Eine solche Nachweisempfindlichkeit des Totalionenstroms war von der Referenzverbindung unbekannt. Nach dem Fragmentogramm bei m/e 270 wurde die Substanzmenge auf nur einige Nanogramm geschätzt. Deshalb wurde unter dem Totalionenstrompeak ein komplettes Massenspek-

trum aufgenommen (Abb.5).

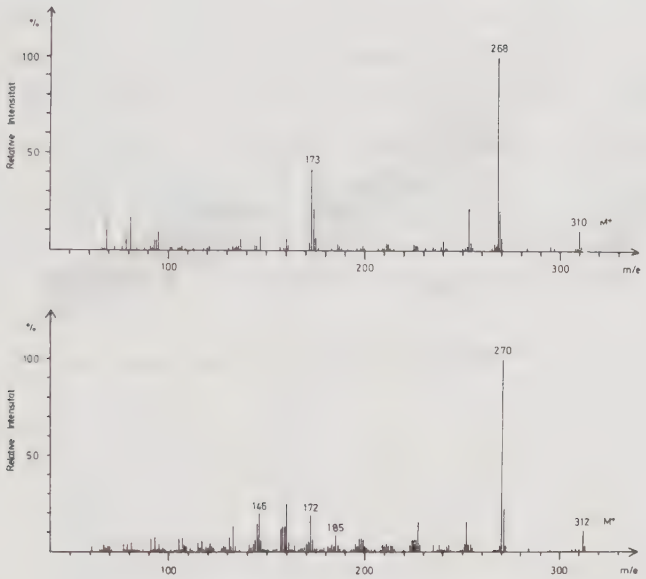

Abb.5:
unten: Massenspektrum von authentischem 16α,17α-Epoxyöstratrienolacetat

oben : Massenspektrum einer unbekannten Verbindung aus dem Inkubationsextrakt

Das erhaltene Spektrum könnte von einer Verbindung stammen, deren Molekulargewicht genau zwei Masseneinheiten geringer als erwartet war. Mit der Fragmentographie war also nicht die gesuchte Verbindung aufgezeichnet worden, sondern bei derselben Retentionszeit mit m/e 270 den um zwei Masseneinheiten höheren Isotopenpeak zu dem Fragmention 268 einer anderen Verbindung, die

sich von dem gesuchten Epoxyd nur durch eine Doppelbindung unterscheidet. Eine gaschromatische Trennung solcher Steroide ist im allgemeinen sehr schwierig. Eine einwandfreie Trennung gelingt jedoch auf Kieselgeldünnschichtplatten, die mit Silbernitrat imprägniert sind. Nach Abtrennung der Dehydroverbindung mit der sogenannten Argentationschromatographie war es möglich, kleine Mengen an dem gesuchten Epoxyd zu isolieren und fragmentographisch nachzuweisen. Im Anschluß daran konnte auch das gesuchte Spektrum von 16α,17α-Epoxyöstratrienol aufgenommen werden (Abb.6).

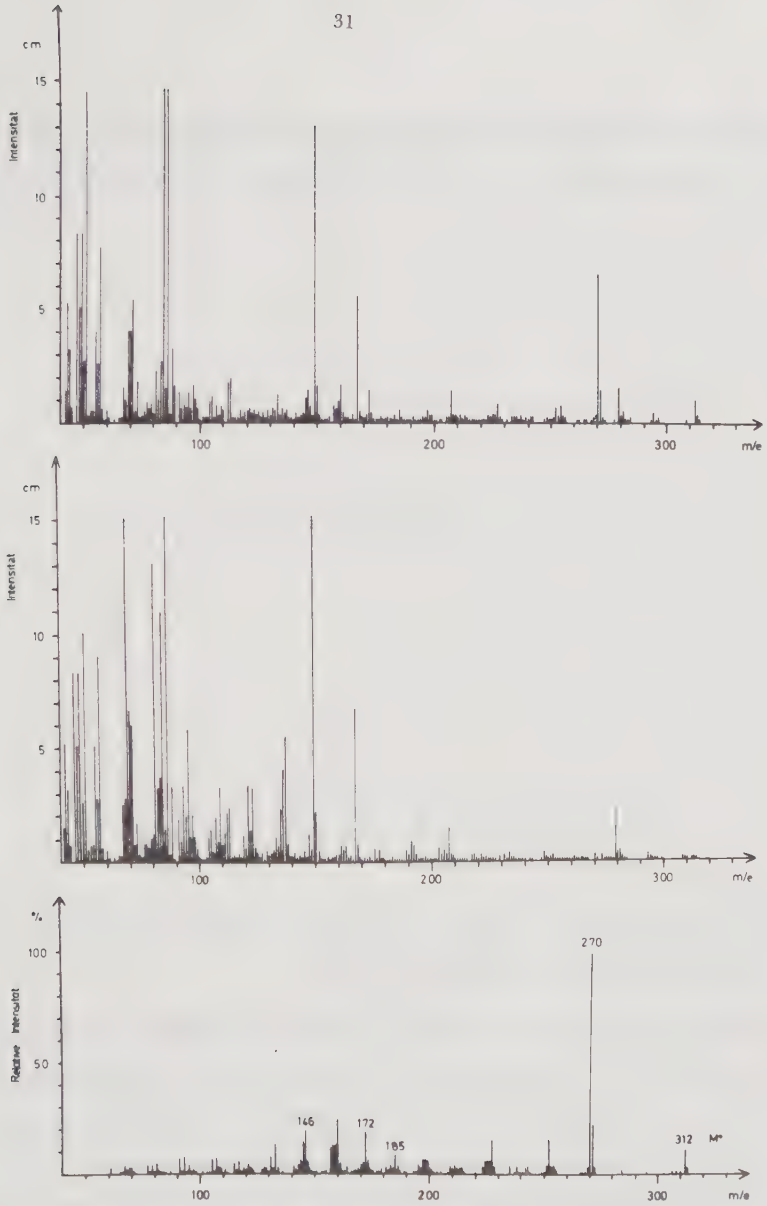

Abb.6: oben: Unkorrigiertes Massenspektrum von 16α,17α-Epoxyöstratrienolacetat aus dem Inkubationsextrakt
Mitte: Untergrundspektrum
unten: Massenspektrum des isolierten 16α,17α-Epoxyöstratrienolacetates nach Substraktion des Untergrundes und Normierung

Sowohl das Spektrum als auch das gaschromatographische Verhalten waren identisch mit der authentischen Referenzverbindung (Abb.7).

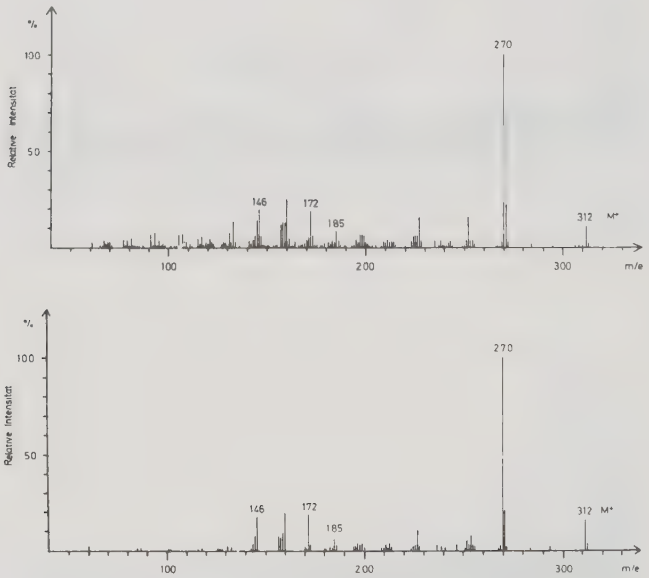

Abb.7:
Massenspektrum des authentischen (oben) und des isolierten 16α, 17α-Epoxyöstratrienolacetates (unten)

In der Abb.6 sieht man zuoberst das unkorrigierte Spektrum, das während der Gaschromatographie des gereinigten Inkubationsextraktes aufgenommen wurde. Unmittelbar vor Erscheinen des GC-Peaks wurde ein Untergrundspektrum aufgenommen, das in dem mittleren Teil der Abb.6 zu sehen ist; nach Subtraktion des Untergrundspektrums und Normierung auf den höchsten Peak = 100 % gelangt man zu dem Spektrum des isolierten Epoxyöstratrienols.

Die Abb.7 zeigt den Vergleich des korrigierten und normierten Spektrums der isolierten Substanz (unten) mit der Referenzverbindung (oben).

4. Diskussion

Grover et al. (12) gelang zum erstenmal der Nachweis der Biogenese von Epoxyden von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen unter Einwirkung mikrosomaler Enzyme. Diese Untersucher setzten Phenanthren, Benzanthrazen und Dibenzanthrazen zu den entsprechenden Epoxyden um. Da die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe als kanzerogen bekannt sind, stellte sich die Frage, ob auch ihre primären Metaboliten, nämlich die Epoxyde, eine ähnliche Wirkung haben oder ob die Epoxydbildung eine Inaktivierung der Wirkung dieser Verbindungen darstellt. Grover (13) konnte an Zellkulturen bei der Gabe von synthetisch dargestellten epoxydierten polyzyklischen Kohlenwasserstoffen deren Kanzerogenität nachweisen. Wegen der strukturellen Ähnlichkeiten der oben genannten polyzyklischen Kohlenwasserstoffe mit den Steroiden schien es sinnvoll, der Frage nachzugehen, ob bei der Oxidation von Doppelbindungen bei Steroiden zunächst auch ein Epoxyd gebildet wird. Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit Inkubationsversuche mit Östratetraenol und Rattenlebermikrosomen und anschließende massenspektrometrische Untersuchungen gemacht. Östratetraenol wurde von Knuppen und Breuer (3) als natürlicher Metabolit des Steroidstoffwechsels beim Menschen identifiziert. Ebenfalls wurde von Knuppen und Breuer (5) gezeigt, daß Östratetraenol und 16α,17α-Epoxyöstratrienol Zwischenprodukte der 16,17-epi-Östriolbiosynthese sein könnten. Bisher konnte 16α,17α-Epoxyöstratrienol als Metabolit von Östratetraenol nicht isoliert werden. Die Möglichkeit eines solchen Stoffwechselweges wurde aber aufgrund der damaligen Versuchsergebnisse an-

genommen (5).

In der vorliegenden in vitro Studie wurde bei den Inkubationsversuchen mit Östratetraenol und Rattenlebermikrosomen Epoxystyrol als Inhibitor zugegeben. Dies geschah in Anlehnung an die Arbeit von Grover et al. (12), die durch die Gabe von Epoxystyrol eine höhere Ausbeute an Epoxyden erzielen konnten. Epoxystyrol sollte bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen die weitere Umsetzung von 16α,17α-Epoxyöstratrienol zu 16,17-epi-Östriol blockieren. Aus der Tabelle 5 läßt sich entnehmen, daß bei Inkubationen unter Zusatz von Epoxystyrol mehr 16α,17α-Epoxyöstratrienol nachweisbar war als ohne Verwendung des Inhibitors.

Zur Identifizierung wurden die kombinierte Gaschromatographie/Fragmentographie und die Massenspektrometrie herangezogen. Diese Methoden, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, übertreffen die bisher bekannten Identifikationsmethoden, wie z.B. die Gaschromatographie und Dünnschichtchromatographie, bei weitem an Genauigkeit und Spezifität. Mit den hier benutzten analytischen Verfahren können geringere Stoffmengen nachgewiesen werden als mit den bisher bekannten Methoden. Weiterhin benötigen die zu untersuchenden Proben bei der Gaschromatographie/Massenfragmentographie nicht eine so umfangreiche Vorreinigung, wie das bei den konventionellen Methoden der Fall ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, 16α,17α-Epoxyöstratrienol anzureichern, um eine eindeutige massenspektrometrische Identifizierung zu ermöglichen. Aufgrund der Versuchsergebnisse und der aufgenommenen Massenspektren konnte bewiesen werden, daß es

sich bei dem primären Stoffwechselprodukt von Östratetraenol um 16α,17α-Epoxyöstratrienol handelt, aus dem dann durch hydrolytische Spaltung 16,17-epi-Östriol gebildet wird.

5. Zusammenfassung

Nach Inkubation von Östratetraenol mit Rattenlebermikrosomen konnte 16α,17α-Epoxyöstratrienol als Metabolit isoliert werden. Es wurden Inkubationen mit und ohne Zugabe von Epoxystyrol als Inhibitor durchgeführt; dabei sollte Epoxystyrol die weitere Umsetzung von 16α,17α-Epoxyöstratrienol zu 16,17-epi-Östriol verhindern. In der Tat konnte die Ausbeute an 16α,17α-Epoxy-Östratrienol bei den Inkubationen wesentlich gesteigert werden, wenn Epoxystyrol als Epoxydlyasehemmer zugesetzt wurde. Die Identifizierung von 16α,17α-Epoxyöstratrienol erfolgte mit Hilfe der kombinierten Gaschromatographie/Massenspektrometrie durch die Aufnahme von Massenspektren.

6. Literaturverzeichnis

1 Breuer H. (1967) Europ. Rev. Endocr. Suppl. 2, 295 - 314.

2 Stylianou M.,Forchelli E.,Tumillo M. & Dorfman R.I. (1961) J. biol. Chem. 236, 692 - 694.

3 Knuppen R. & Breuer H. (1963) Acta Endocr. 42, 129 - 134.

4 Breuer H. & Knuppen R. (1961) Biochim. biophys. Acta 49, 620 - 621.

5 Knuppen R. & Breuer H. (1962) Z. physiol. Chemie 328, 226 - 234.

6 Stimmel B.F. & Notchev V.D. (1961) Fed. Proc. 20, 200.

7 Gower D.B. (1972) J. Steroid Biochem. 3, 45 - 103.

8 Huffman M.N.,Lott M.H. & Tillotson A. (1955) J. biol. Chem. 217, 103 - 106.

9 Caglioti L. & Magi M. (1962) Tetrahedron Lett. 26, 1261 - 1263.

10 Prelog V.,Ruzicka L. & Wieland P. (1945) Helv.chim. Acta 28, 250 - 256.

11 Oberholm R. (1971) Anal. Biochem.'44, 1 - 11.

12 Grover P.L.,Hewer A. & Sims P. (1971) FEBS Lett. 18, 76 - 80.

13 Grover P.L.,Sims P.,Huberman E.,Marquardt H.,Kuroki T. & Heidelberger C. (1971) Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 68, 1098 - 1101.

Dankvermerk

Herrn Prof.Dr.H. Breuer danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die Durchsicht dieser Arbeit.
Herrn Diplom-Chemiker Dr.L.Siekmann danke ich für die Überlassung von Materialien sowie seine wertvollen Anregungen.
Frau Martin danke ich für die massenspektrometrischen Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 4.3.1950 wurde ich als Sohn des Lokomotivführers Josef Thull und seiner Ehefrau Hildegard, geb.Strauß, in Glan-Münchweiler, Rheinland-Pfalz, geboren.1956 trat ich in die Volksschule in Glan-Münchweiler ein. Von 1961 - 1969 besuchte ich das Staatliche Gymnasium in Kusel. Nach dem Abitur wurde ich im Juli 1969 zum Grundwehrdienst einberufen. 1970 begann ich das Medizinstudium in Bonn, wo ich im März 1971 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1972 im September die ärztliche Vorprüfung ablegte. Von 1973 - 1975 arbeitete ich im Institut für Klinische Biochemie (Direktor: Prof.Dr.H.Breuer) unter Leitung von Herrn Dr.L.Siekmann im Rahmen meiner Doktorarbeit über das Thema: "Biogenese von 16α,17α-Epoxyöstratrienol in Rattenlebermikrosomen".

Im Januar1976 legte ich das Staatsexamen in Bonn ab.

Herstellung: Druck und Verlag Ing. H. O. Hövelborn 5216 Niederkassel-Mondorf, Provinzialstraße 25
Telefon Bonn 46 27 13
Archiv-Nr.: 097603